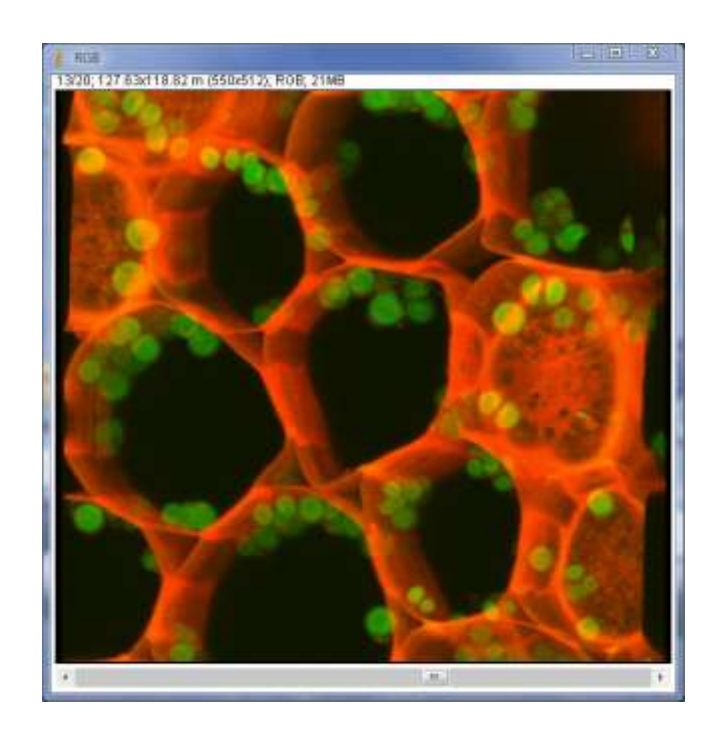




Manual de Usuario del programa Confocal Uniovi ImageJ

(Versión 1.2)



Ángel Martínez Nistal
Marta Alonso Guervós

SERVICIOS CIENTÍFICO-TÉCNICOS
Servicio de Microscopía Fotónica y Proceso de Imágenes.





INDICE:

Contenido

Introducción.

ConfocalUniovi Image J es una colección de funciones y "plugins" del programa ImageJ, dirigidas a visualizar y procesar imágenes obtenidas con el Microscopio Confocal Leica TCS SP2 AOBS.

Image J es un programa de proceso y análisis de imágenes de dominio público ("open source"), realizado en lenguaje Java. Su author, Wayne Rasband (1) trabaja en el Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA. Existen versiones del programa para Windows, Mac y Linux.

Con el paso de los años el programa se ha visto complementado por un creciente número de "plugins" y macros, desarrolladas por un gran número de colaboradores. Estos plugins se pueden añadir a conveniencia al programa original. Toda la información sobre ImageJ se puede encontrar en: http://rsb.info.nih.gov/ij/

En **ConfocalUniovi ImageJ** se han agrupado, junto al programa ImageJ, una serie de "plugins" de gran utilidad para el proceso de imágenes de confocal. Todas las funciones del programa se agrupan en una interface gráfica con un conjunto de botones que facilitan su utilización por los usuarios.

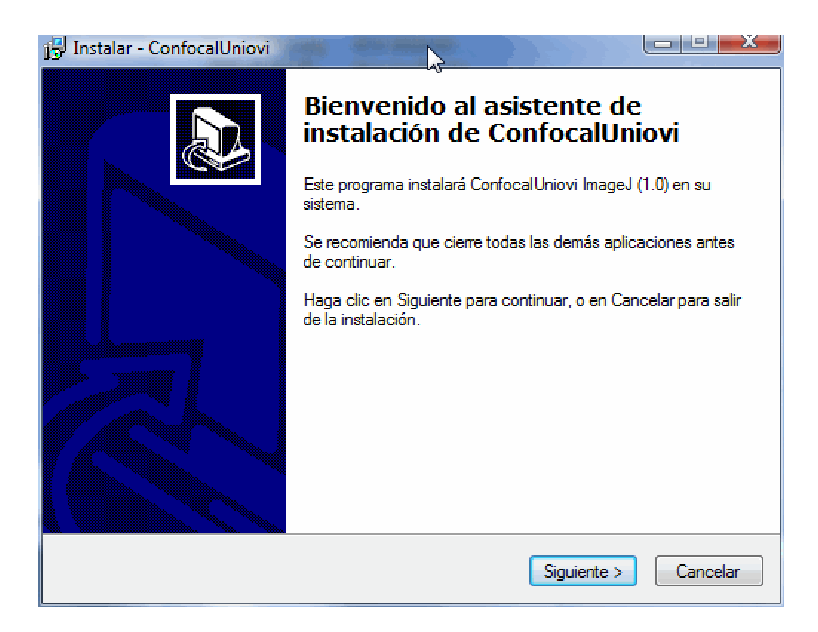
Instalación.

ConfocalUniovi Image J incluye la versión para Windows de ImageJ . Para su instalación se necesita un ordenador con Windows 2000, XP , Vista o 7, con 512 Mb de RAM.

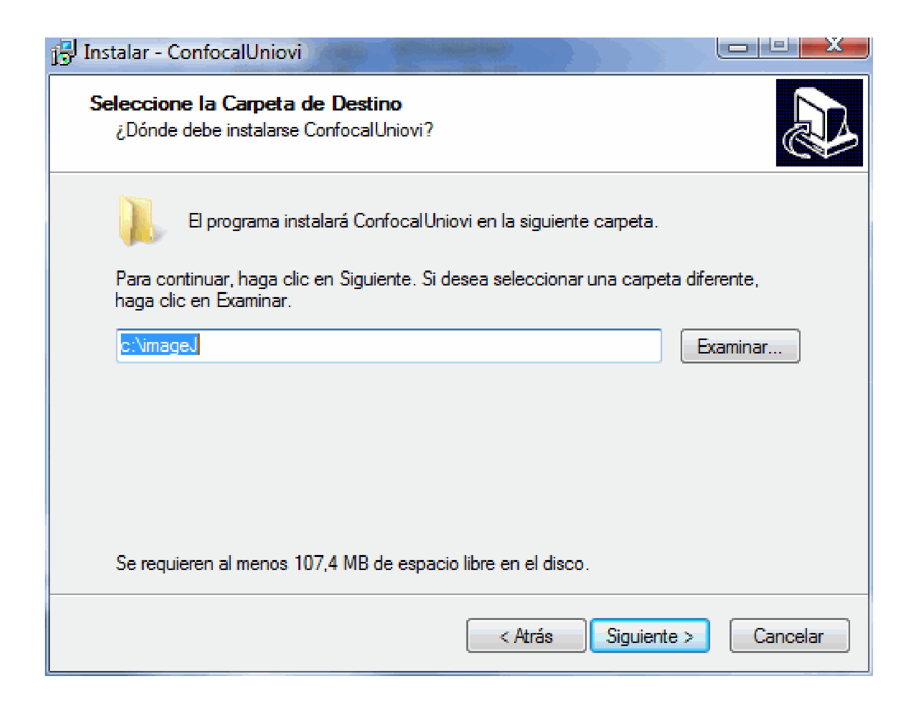
Se puede descargar de la página web del Servicio de Proceso de Imágenes de la Universidad de Oviedo :
http://www.sct.uniovi.es/index.php?option=com_content&task=view&id=224&Itemid=145

Una vez descargado el fichero "setup_Confocal_Uniovi_ImageJ.exe", lo ejecutaremos y comenzará su instalación.

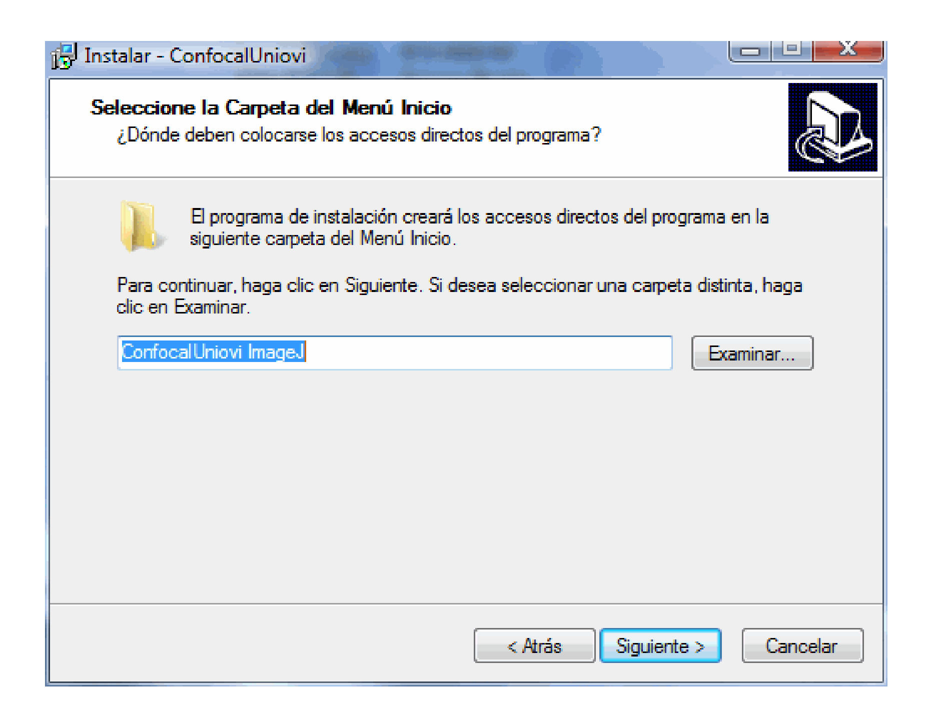
Nos aparece la pantalla siguiente:



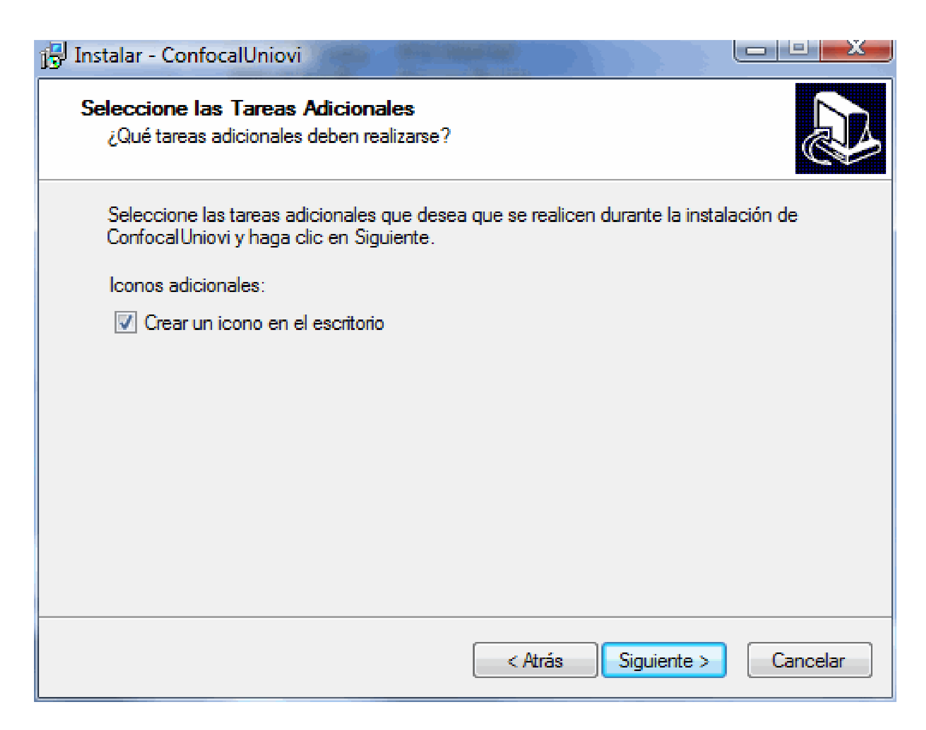
Pulsaremos "siguiente" y nos preguntará por el directorio de instalación, dejaremos el que nos aparece por defecto que será c:\imageJ y pulsaremos "siguiente"



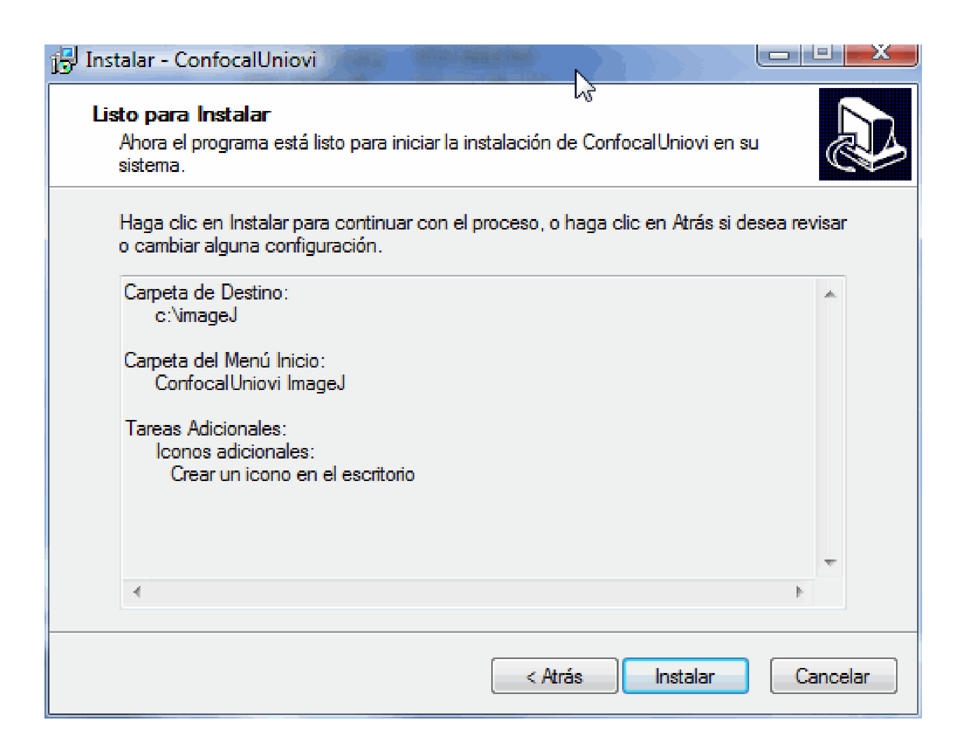
Introduciremos el nombre de la Carpeta del Menú de Inicio y volveremos a pulsar siguiente.



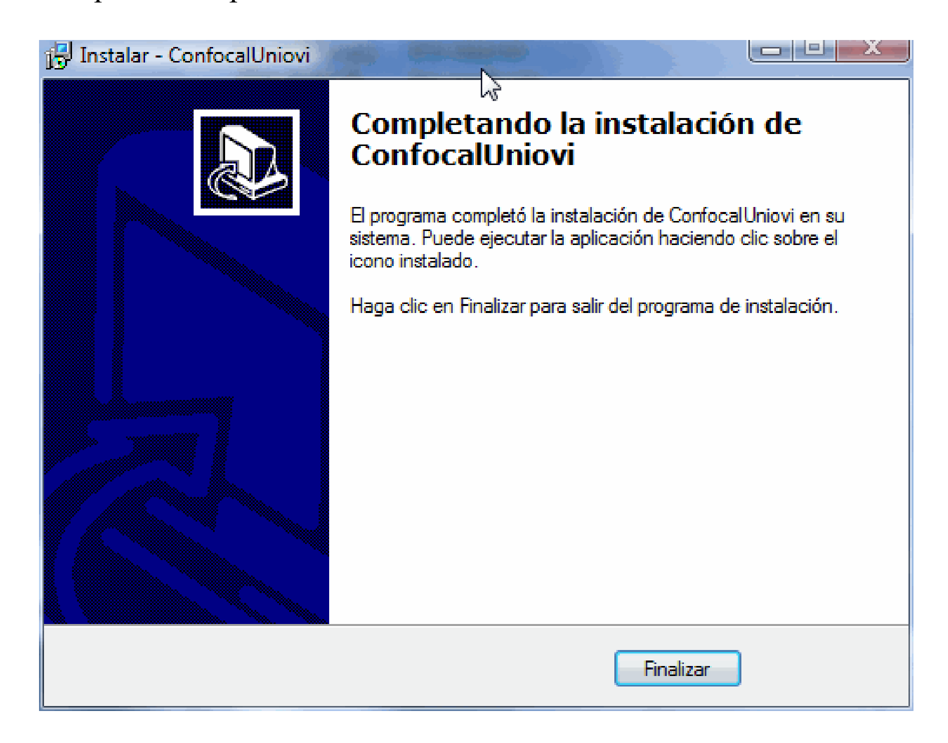
Si deseamos crear un icono de acceso directo en el escritorio marcaremos la opción correspondiente.



Finalmente se nos presentarán las opciones elegidas y si estamos de acuerdo pulsaremos el botón de “Instalar”.



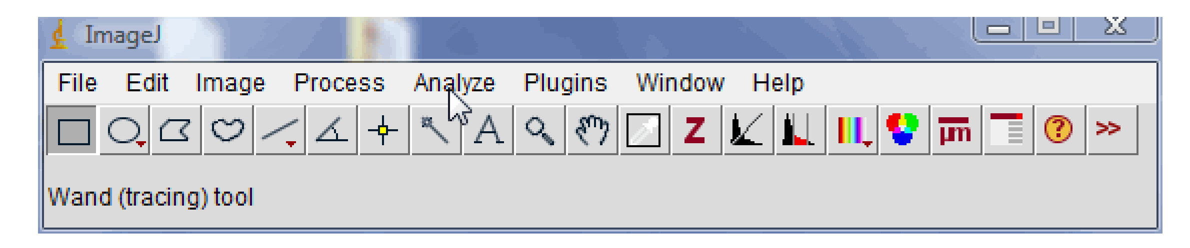
Una vez finalizado el proceso de instalación nos aparece la siguiente ventana indicándonos que se completó con éxito la instalación.

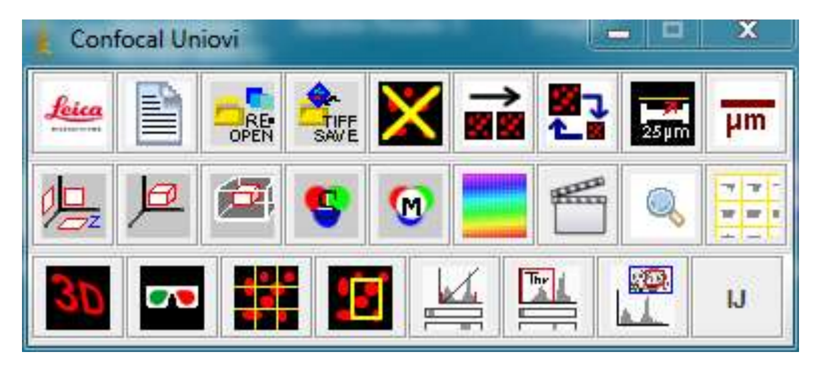


Si durante la instalación hemos seleccionado la opción correspondiente, al finalizar la instalación, en el escritorio, nos aparecerá un icono para acceder directamente al programa.

Funcionamiento.

Al arrancar el programa nos aparecen dos menús: el general de ImageJ y el que contiene las funciones de ConfocalUniovi ImageJ.





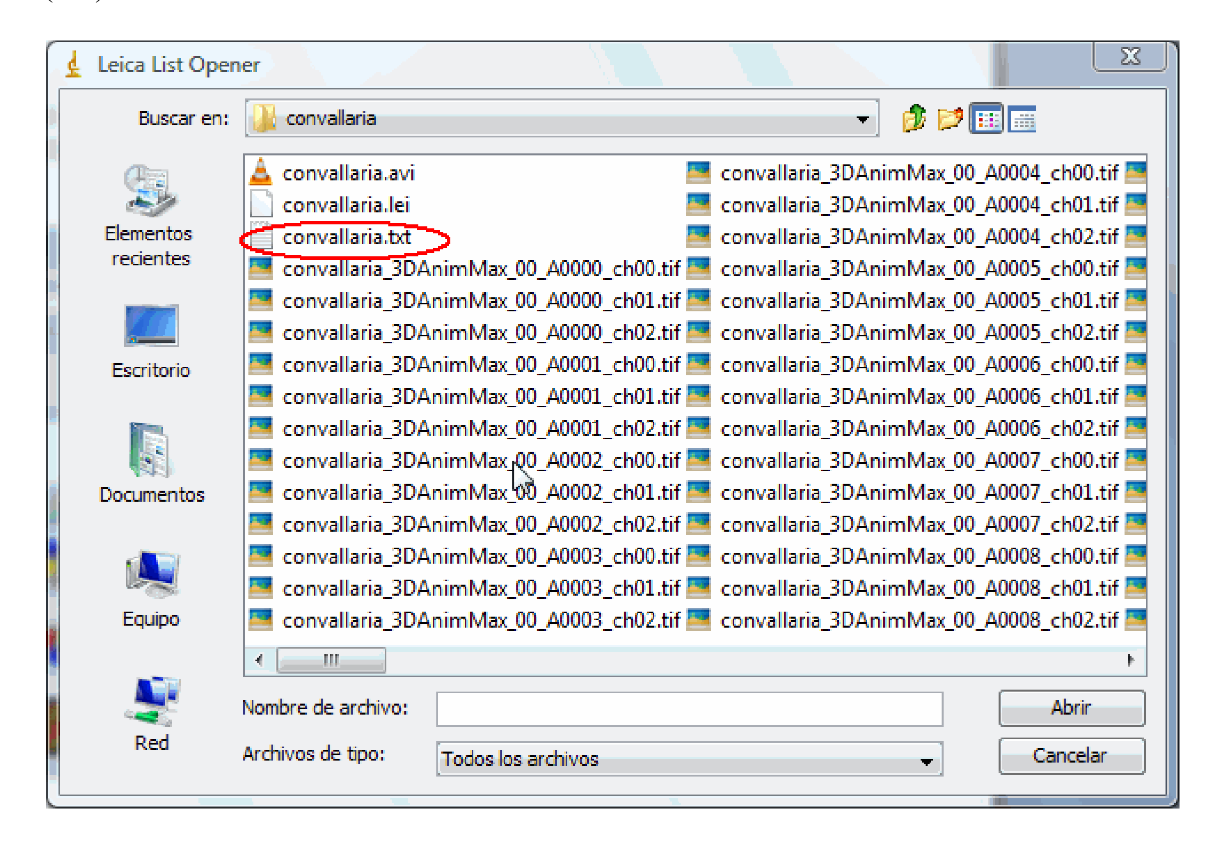
A continuación se describen cada una de las funciones incluidas en el menú: Confocal Uniovi. Para conocer el funcionamiento del menu principal de ImagJ ir a la documentación "on line" de la página Web: http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/.



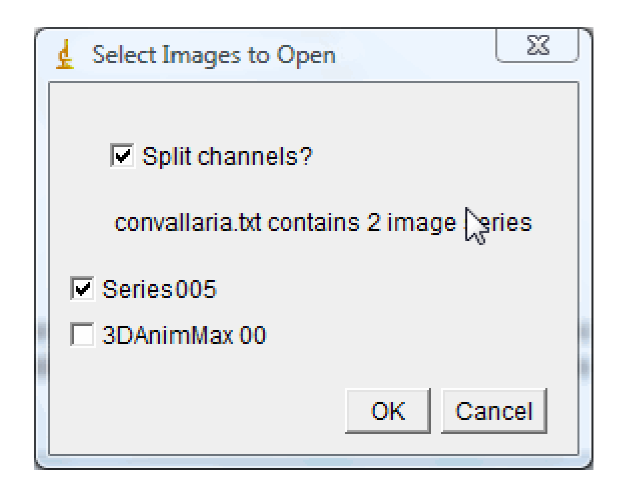
Leer imagen del Confocal Leica.

Permite abrir imágenes almacenadas en el formato del Microscopio Confocal Leica TCS SP2 AOBS. Este equipo almacena las imágenes por experimentos. Cada experimento se almacena en un subdirectorio que contiene: un fichero (lei) para la apertura del experimento en el microscopio confocal, un fichero de texto (txt) con la información de la configuración del microscopio (objetivos, ganancia, apertura del pinhole, tamaño de la imagen , etc) y un conjunto de imágenes que a su vez pueden estar formadas por series de imágenes de uno o varios canales. Cada una de las imágenes es un fichero .tif.

Al pulsar en el botón se nos abrirá el explorador de archivos, buscaremos el subdirectorio del experimento que nos interesa y seleccionaremos el fichero de texto (.txt)

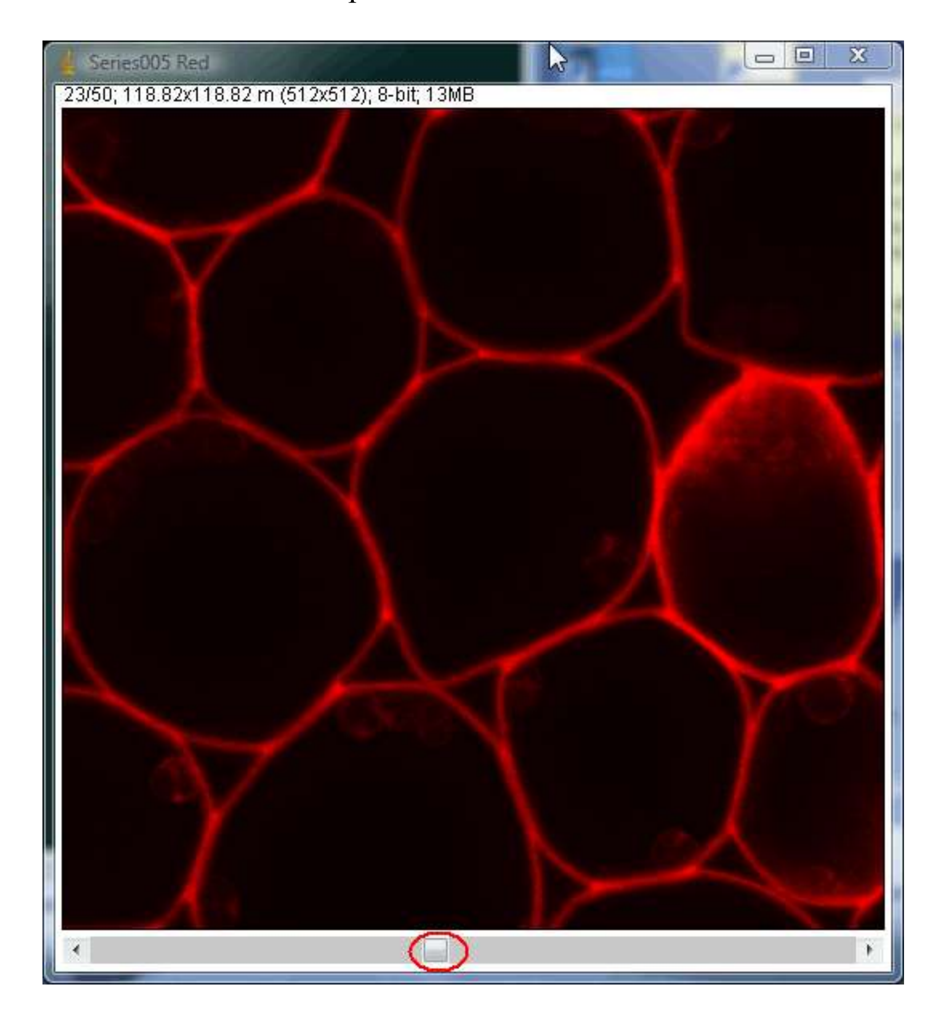


Nos aparecerá la siguiente ventana que nos permite escoger que imagen o conjunto de imágenes (en caso de que se trate de una serie) queremos abrir y, en caso de tener más de un canal, si queremos verlas como imágenes separadas o intercaladas en una serie.



Es aconsejable seleccionar la opción de "Split Channels" para ver los canales como imágenes separadas.

Si la imagen tiene más de una sección podemos desplazarnos por todo el conjunto moviendo la barra de la parte inferior.

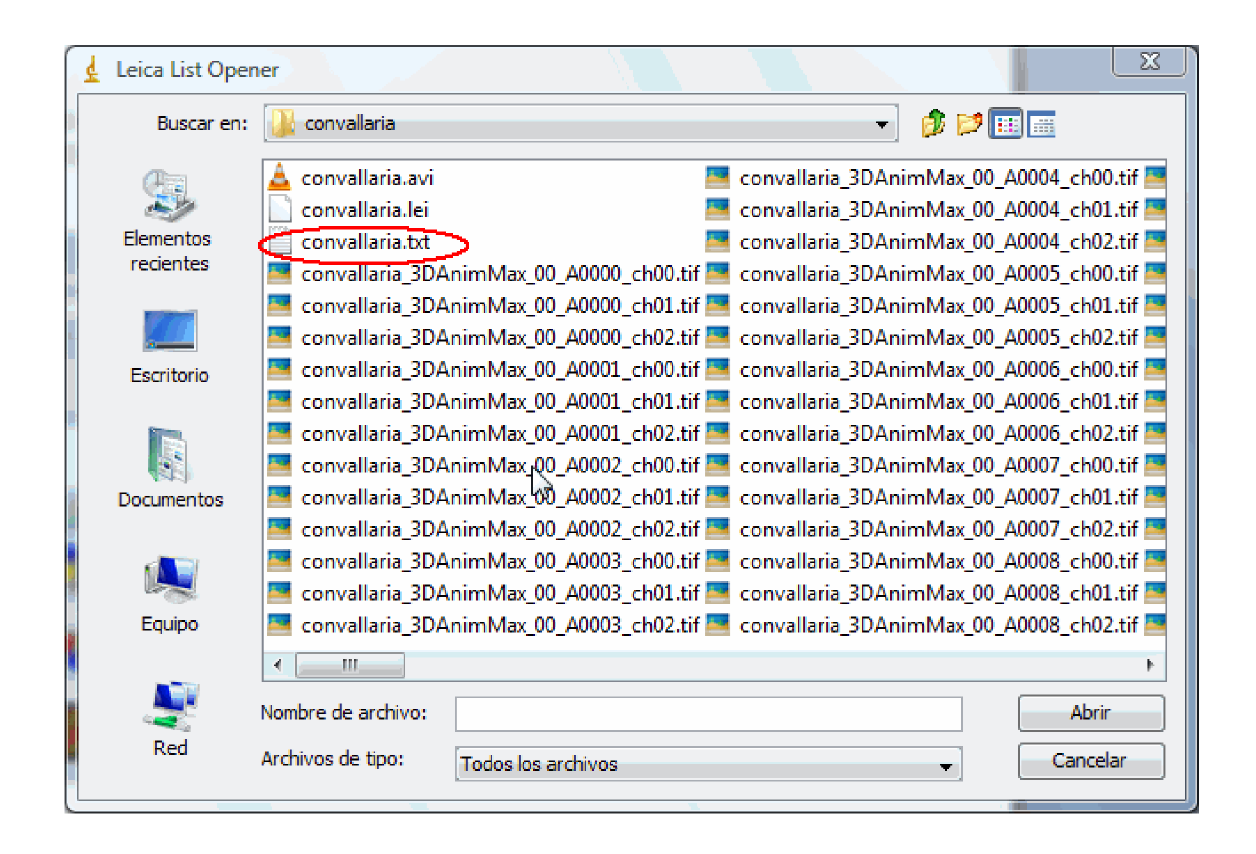




Leer TXT

Permite abrir el fichero de texto del archivo Leica para conocer la información de la configuración del microscopio y las características de adquisición de las imágenes del fichero (objetivos, ganancia, apertura del pinhole, tamaño de la imagen , etc).

Al pulsar el botón se nos abrirá el explorador de archivos, buscaremos el subdirectorio del experimento que nos interesa y seleccionaremos el fichero de texto (.txt):





Abrir archivos simples

Permite abrir cualquier imagen tiff tanto de confocal como de cualquier otra fuente

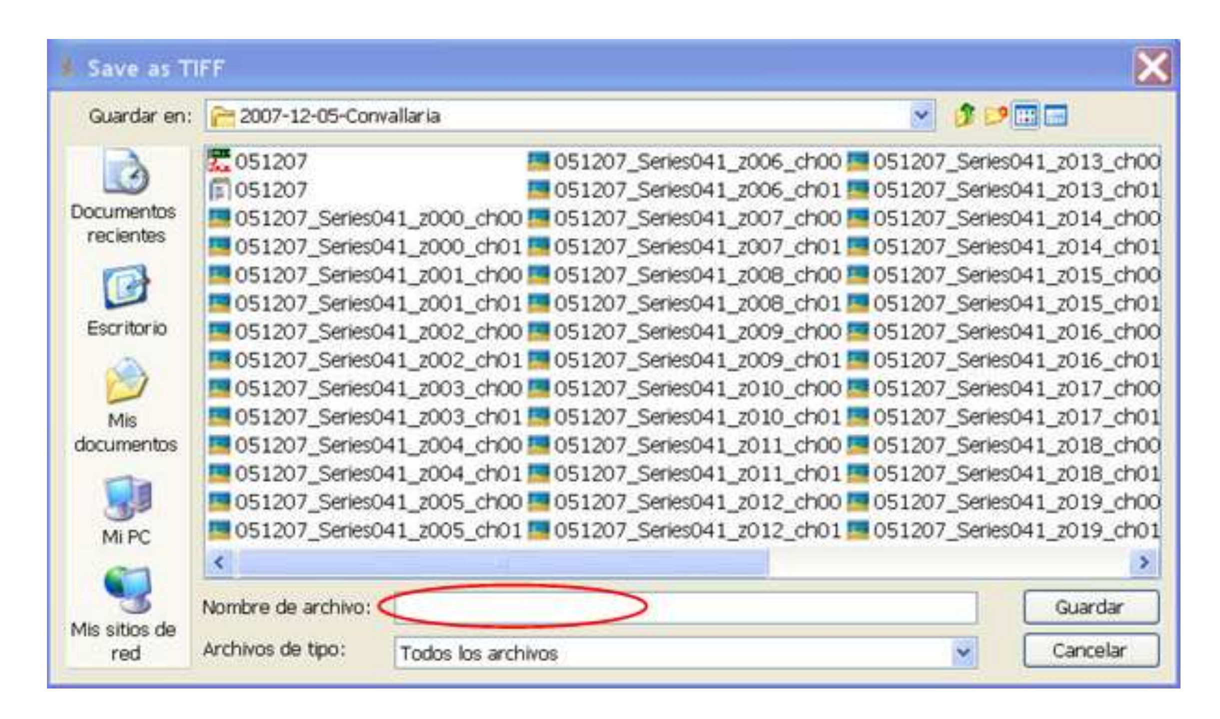
Al pulsar el botón se nos abrirá el explorador de archivos y seleccionaremos el fichero de imagen (.tiff) que nos interesa.



Salvar TIFF

Permite salvar como tiff la imagen seleccionada.

Al pulsar el botón se nos abrirá el explorador de archivos, buscaremos la carpeta donde queremos guardar el fichero, escribiremos el nombre del fichero y pulsaremos el botón guardar

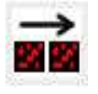


Si el fichero es una serie de imágenes se salvará toda le serie en un único fichero de imagen .



Cerrar imágenes

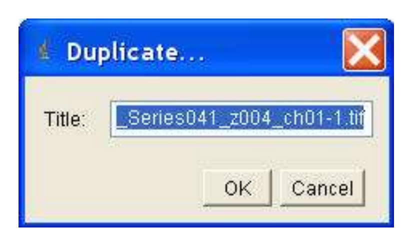
Al pulsar sobre esté icono se cierran todas las imágenes abiertas



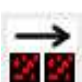
Duplicar imagen

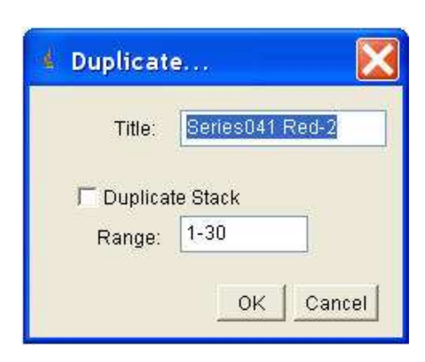
Permite duplicar el fichero seleccionado, ya sea una serie o una única imagen

Si tenemos seleccionada la ventana de una imagen, al pulsar el botón se abrirá la siguiente ventana:



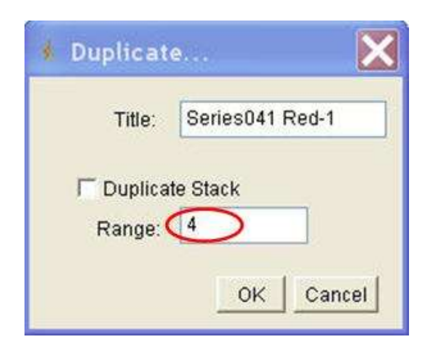
Escribiremos un nombre para denominar la nueva imagen o dejaremos el que nos asigna el programa por defecto, pulsaremos OK y se creará una copia de la imagen.

Si tenemos seleccionada la ventana de una serie, al pulsar el botón  se abrirá la siguiente ventana :

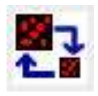


Si marcamos la casilla "duplicate stack" y pulsamos OK, se creará una copia de la serie.

Si queremos duplicar sólo una imagen de la serie, desactivaremos la casilla "duplicate stack" y escribiremos en la casilla "range" el número de posicionamiento de dicha imagen (en el ejemplo se selecciona la sección número 4 de las 30 secciones totales de la serie)



Si queremos duplicar un rango de imágenes de una serie , en la casilla "range", escribiremos el rango que deseamos, por ejemplo 1-10 y nos duplicará las 10 primeras imágenes de la serie.



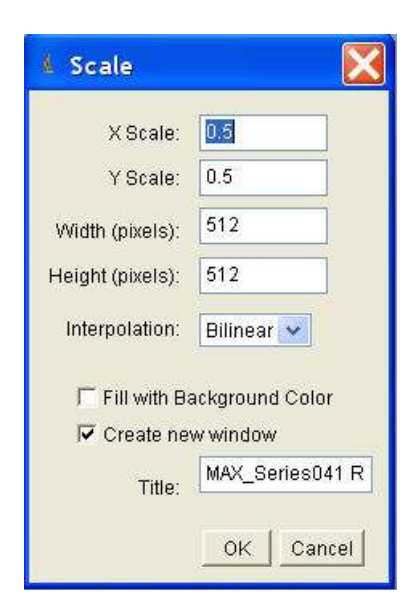
Escalar imagen

Permite modificar el número de píxeles de una imagen.

Al pulsar el icono se abre una ventana en la que podemos escribir el número de pixeles de la nueva imagen o bien el factor de aumento o reducción que le queremos aplicar. Cuando se trata de imágenes cuadradas el valor de X scale o Yscale serán iguales, lo mismo sucede con los valores de ancho (width) y altura (height)

En caso de que estemos aumentando el número de píxeles de la imagen debemos indicar si queremos que los píxeles se creen como interpolación de los existentes con sus vecinos más próximos (bilinear o cúbica) o no queremos interpolación (none).

Si la casilla “Craete new window” está activada, la nueva imagen aparecerá en una nueva ventana. Si se desactiva esta opción, la imagen original se elimina y sólo aparecerá la imagen escalada.





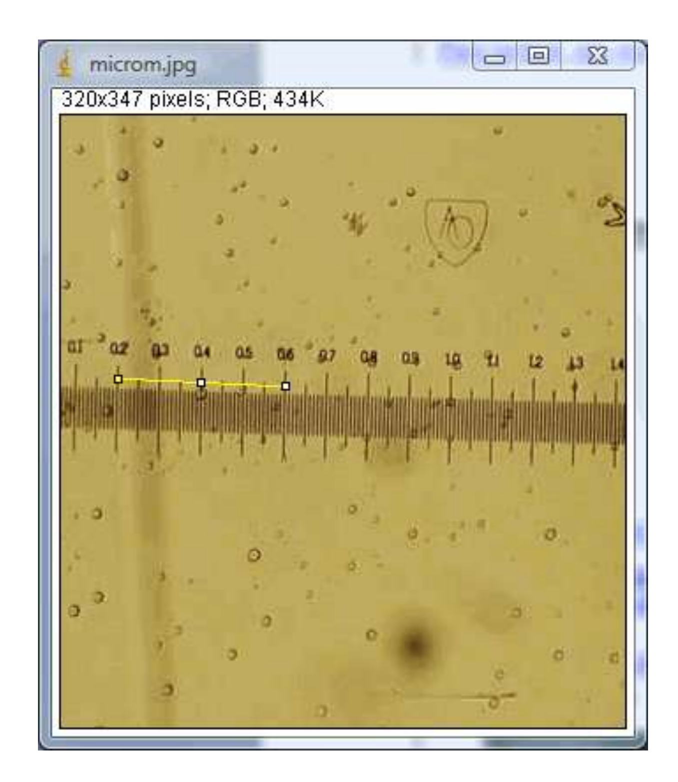
Calibrar imagen.

Con esta función podremos realizar una calibración de la imagen de manera que las medidas que hagamos se obtengan en unidades reales (micras, mm, cm, etc).

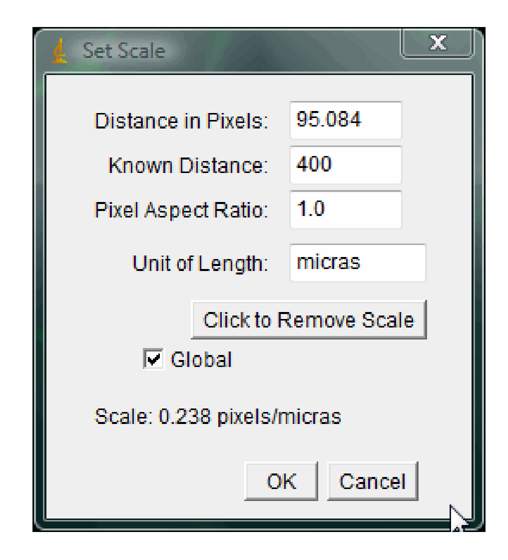
Para calibrar una imagen podemos proceder de dos maneras:

- **1 Si tenemos marcada en la imagen una distancia conocida.**

En este caso, con la herramienta línea del menú de ImageJ marcaremos la distancia conocida.



A continuación pulsaremos en el icono "calibrar la imagen" y se nos abrirá el siguiente menú:

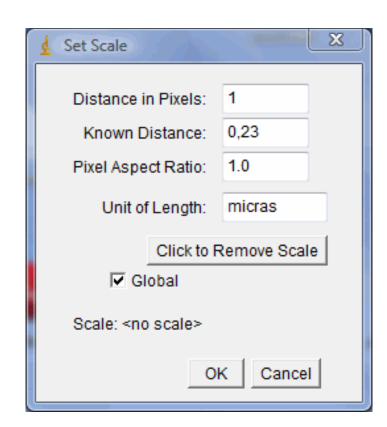


El primer valor "Distance in pixels" corresponde a la longitud en píxeles de la línea marcada y no debemos tocarlo. El siguiente valor "Know Distance" corresponde a la distancia en unidades reales de la línea marcada, en este caso 400 micras . El siguiente valor "pixel ratio" se refiere a la relación longitud/anchura del pixel. Siempre que trabajemos con píxeles cuadrados su valor será 1.0. En el campo "Unit of Length" teclearemos las unidades de medida (micras en este caso). Finalmente marcaremos el campo "global" si queremos que este factor de calibración se aplique

a todas las imágenes que abramos. En caso de que deseemos que se aplique sólo a esta imagen lo dejaremos sin marcar.

- **2 si conocemos el valor de calibración del píxel de la imagen.**

En el caso de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS el equipo guarda la calibración del píxel en el fichero TXT. Abriremos el fichero txt del experimento, buscaremos el valor de la calibración del píxel (suele venir como "voxel with" y "voxel height") y teclearemos su valor en el campo "Know Distance". En el campo "Distance in Pixels" pondremos el valor 1 y el resto de los valores haremos como en el caso anterior.



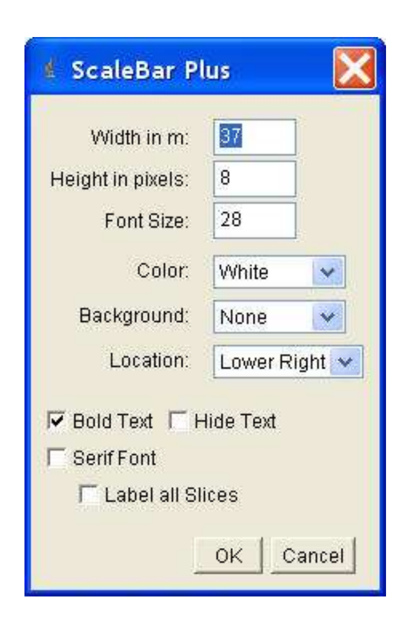
Finalmente pulsaremos OK para aplicar esta calibración. En este momento aparece en la parte superior de la imagen la información de sus dimensiones reales, con las dimensiones en píxeles entre paréntesis.



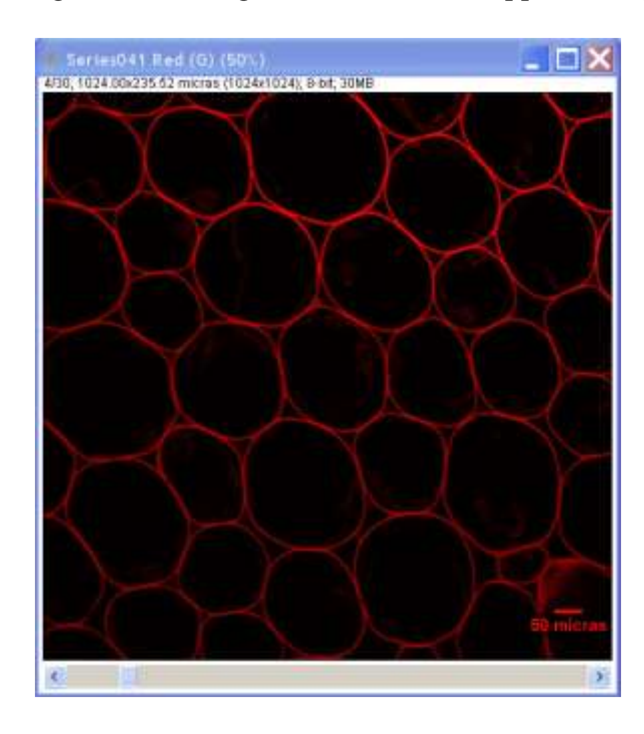
Pintar barra de escala

Con está función podemos incluir una barra de escala en una imagen/serie/proyección. Primero debemos haber calibrado la imagen de trabajo siguiendo las instrucciones explicadas en el apartado anterior (Calibrar imagen).

Al pulsar el icono se abrirá la siguiente ventana:



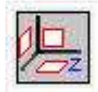
Escribiremos en “with in m” la longitud de barra de escala que deseamos añadir a nuestra imagen/serie/proyección y en “Hight in pixels” el grosor de la barra de escala. En “ Location” podemos escoger la posición donde colocar la barra de escala: “upper right”, “lower right”, “lower left”, “upper left” (La opción “at selection” no funciona).



El color de la escala será el de la paleta de colores LUT que tenga la imagen seleccionada, por tanto las opciones “Color” y “Background” de la escala no tienen utilidad y es preferible dejarlas como aparecen por defecto: “Color” = “White” y “Background” = “None”.

Si tenemos una serie abierta y activamos la opción “Label all Slices”, la barra de escala aparecerá en todas las imágenes de la serie.

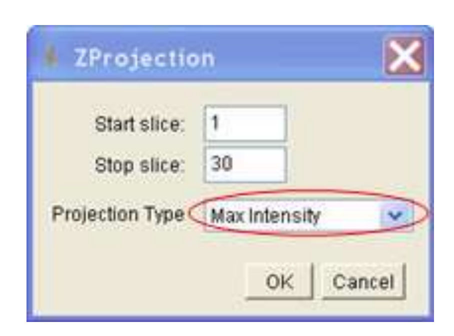
El texto que sale debajo de la barra de escala lo podemos poner en negrita marcando la casilla “Bold Text”, cambiar entre dos tipos de letra marcando la casilla “Serif Font” o cambiar el tamaño de letra escribiendo en “Font Size”. Si marcamos la casilla “Hide text” el texto desaparece y sólo veremos la barra de escala.



Proyección Z

Permite realizar una proyección en Z a partir de una serie de imágenes.

Al pulsar el icono de proyección Z aparece la siguiente ventana:



En la opción “Projection Type” podemos seleccionar entre varios tipos de proyecciones:

- “**Average Intensity**”: cada pixel de la proyección corresponde con el valor medio de cada columna
- “**Max Intensity**”: cada pixel de la proyección corresponde con el píxel de valor máximo de cada columna.
- “**Min Intensity**”: cada pixel de la proyección corresponde con el píxel de valor mínimo de cada columna.
- “**Sum Slides**”: cada pixel de la proyección corresponde con la suma de los valores de los píxeles de esa columna. La imagen resultante es una imagen de 32 bits por píxel para que los valores de la imagen resultante puedan ser superiores a 255
- “**Standard Deviation**”: cada pixel de la proyección corrresponde a la desviación standard de los píxeles de esa columna. La imagen resultante es una imagen de 32 bits por píxel para que puedan tener píxeles con valores decimales
- “**Median**”: cada pixel de la proyección corrresponde al valor de la mediana de los píxeles de esa columna.

El tipo de proyección más utilizado habitualmente es el “Max intensity”.

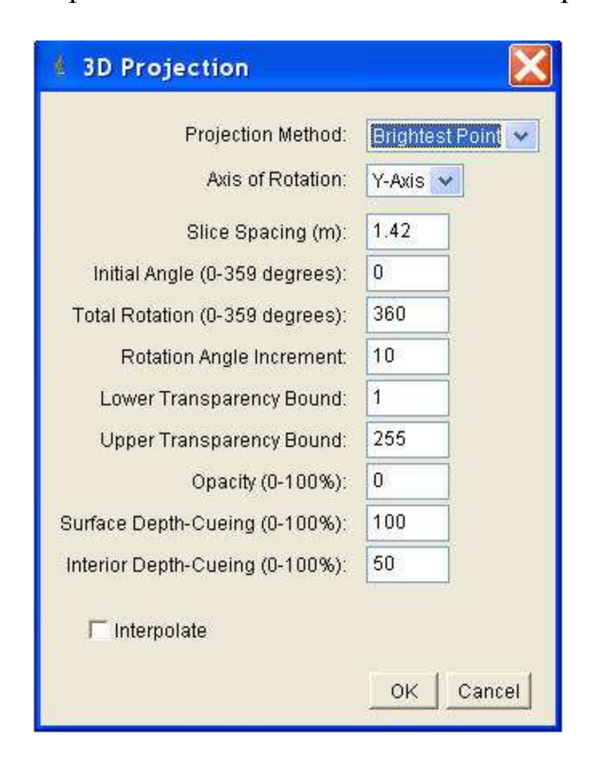
Si deseamos hacer una proyección de un número determinado de secciones dentro de la serie, podemos escribir el número de la imagen de inicio y de final de la proyección en los apartados “Start slide” y “ Stop slide”, respectivamente.



Proyección 3D

Permite realizar, en forma de animación, una proyección en Z desde distintos ángulos para tener una vision completa de la estructura tridimensional de la muestra. Para utilizar está función debemos trabajar con una serie de imágenes.

Al pulsar el icono de reconstrucción 3D aparece la siguiente ventana:



- “Projection method”: Nos permite elegir entre 3 métodos: “Nearest point”, “Brightest Point” y “Mean value”. El más utilizado es el “Brightest Point”

- “Axis of rotation”: Podemos elegir entre rotar la reconstrucción tridimensional en el eje X, el Y o el Z.

- Slide spacing: es la distancia entre secciones ópticas. Para imágenes obtenidas con el microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS el equipo guarda esta información en el fichero TXT: Abriremos el fichero txt del experimento pulsando el icono “leer TXT” y buscaremos el valor de “Voxel-Depth (μm)”.

- “Initial angle”: indicaremos el ángulo donde queremos iniciar la animación.
- “Total rotation”: indicaremos los grados totales de la animación.
- “Rotation angle increment”: indicaremos el incremento en ángulos entre una posición y la siguiente.
- Los parámetros de “Lower transparency bound”, “Upper transparency bound” y “Opacity” están relacionados con la intensidad de los pixels en la reconstrucción 3D. Se recomienda dejar los que aparecen por defecto.

- “Surface Depth-Cueing” y “Interior Depth-Cueing”: Dejar el dato que aparece por defecto; sólo se aplica en series con un gran número de secciones ópticas

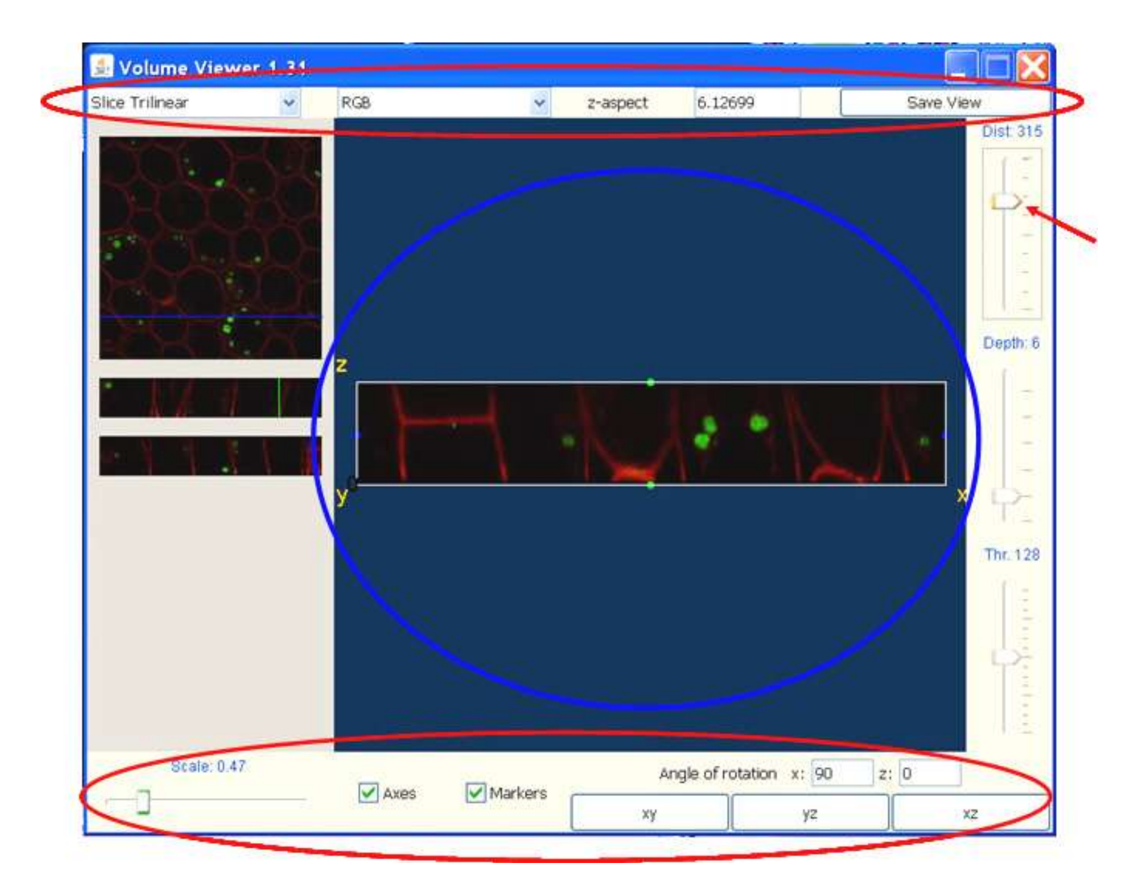
-“Interpolate”. Si marcamos esta casilla el programa genera la información entre planos obteniendo una reconstrucción 3D de mayor calidad. Si la dejamos sin marcar los píxeles correspondientes a zonas entre planos aparecen en negro. Es aconsejable utilizar esta opción aunque el proceso de reconstrucción sea más lento.



Secciones ortogonales

Permite realizar secciones ortogonales de un volumen de una serie de forma interactiva, desplazándose en cualquier eje sobre la serie y pudiendo capturar imágenes. Para utilizar está función debemos trabajar con una serie de imágenes.

Al pulsar el icono aparece la ventana del visor interactivo de volumen de ImageJ.



En el centro aparece la imagen del visor interactivo (círculo azul).

En la zona inferior de la ventana tenemos las opciones para:
1- cambiar la escala de la imagen que aparece en el visor interactivo (“Scale”)
2- activar o desactivar los ejes (axes) y las marcas (“Markers”) del visor interactivo
3- cambiar el ángulo de visión del volumen pulsando en las casilla “xy”, “yz”, “xz”
4- definir en “angle of rotation” el ángulo x y z con el que nosotros queremos estudiar nuestro volumen.

Para desplazarnos interactivamente sobre el volumen de nuestra serie, pulsaremos la barra indicada con una flecha roja en la ventana del visor interactivo de volumen de ImageJ y desplazaremos el ratón. La imagen del visor interactivo irá cambiando según nos desplacemos en los ejes seleccionados. En el margen izquierdo de la ventana se representa la información de los tres ejes (xy, xz y yz) y se señala en cada eje con una línea la posición a la que corresponde la imagen que aparece en el visor interactivo.

Si queremos salvar la imagen que aparece en el visor interactivo, pulsaremos la casilla “save view” en la zona superior derecha de la ventana.



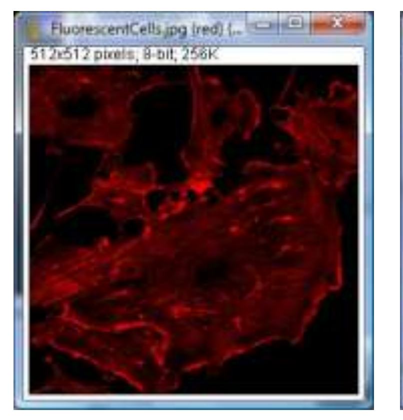
Separar bandas color

Permite separar una imagen RGB en tres imágenes independientes: rojo, verde y azul.

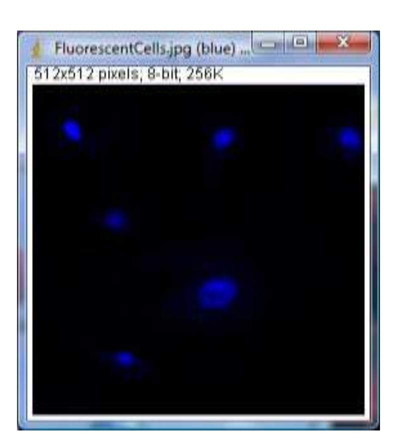


Mezclar bandas color

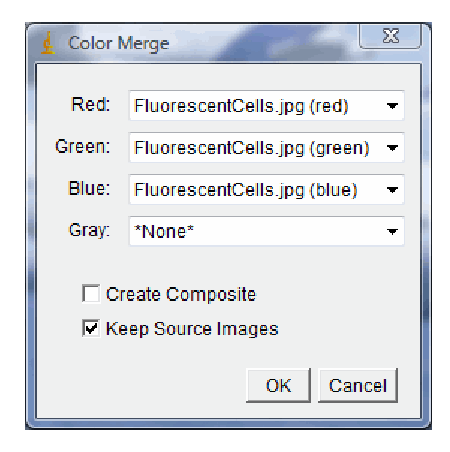
Genera una imagen mezcla a partir de imágenes de tres bandas de colores distintos. Esta función permite mezclar imágenes de dos o tres fluorocromos distintos en una única imagen. Por ejemplo si tenemos las tres imágenes siguientes:



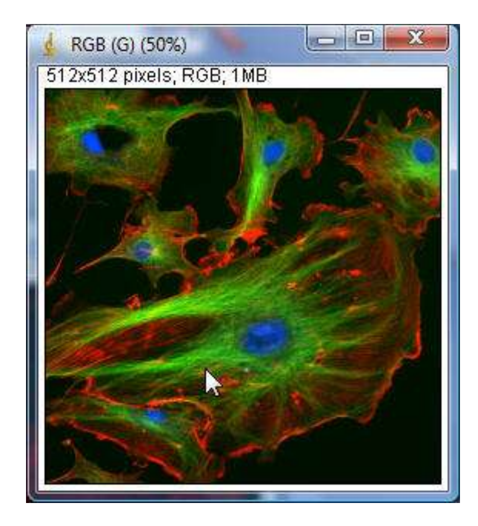




Al pulsar en este icono se abre la ventana:



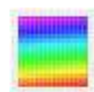
Se seleccionará para cada color el nombre de la imagen correspondiente. En nuestro ejemplo queremos mezclar una imagen roja, una verde y una azul y no tenemos imagen gris. La imagen resultante es la siguiente.



A esta imagen de tres bandas de fluorescencia se le podría añadir una imagen de transmisión o de contraste de fases, incluyendo su nombre en el campo correspondiente a imagen gris.

Seleccionando la opción "Keep Source Image" las imágenes originales de cada color no se eliminan de la pantalla.

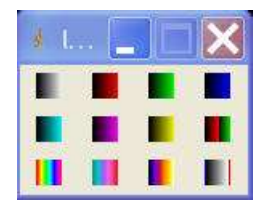
Con esta función podemos mezclar imágenes individuales o series.



Cargar LUT

Permite aplicar una paleta de colores a una imagen/serie/proyección.

Al pulsar este icono se abre la siguiente ventana:

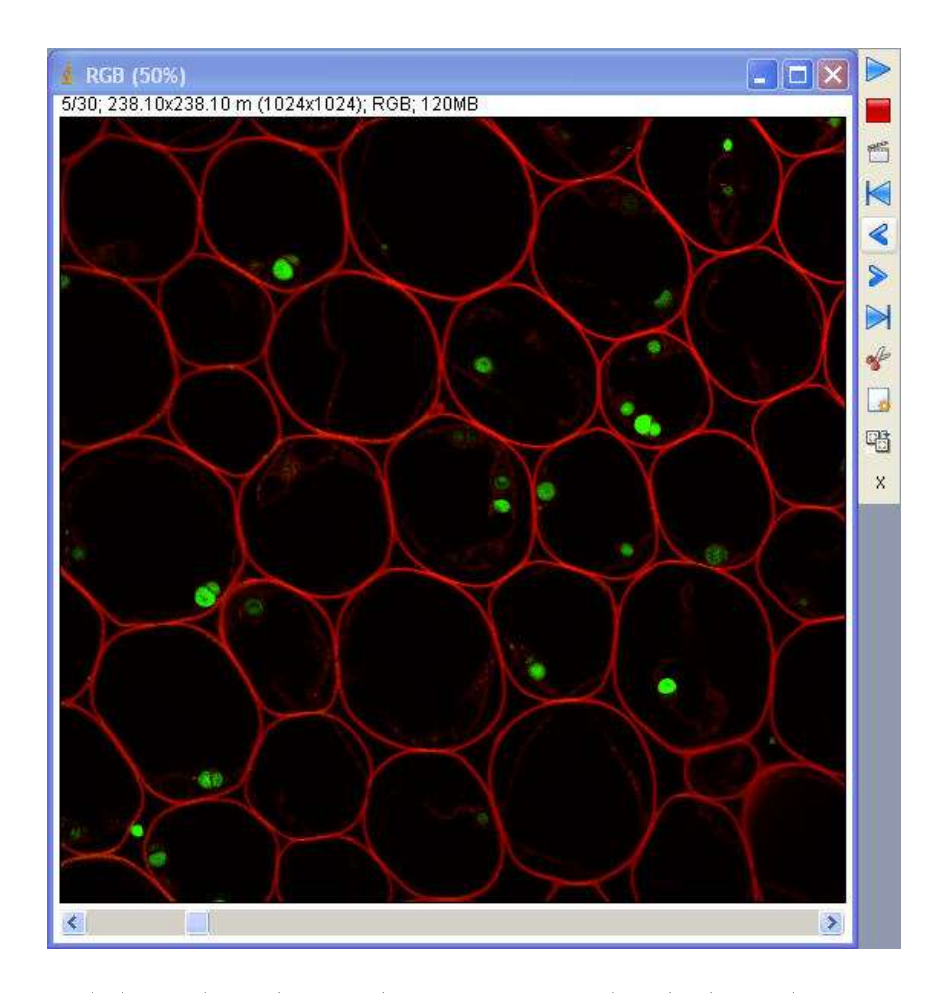


Seleccionando una de las paletas de colores, nuestra imagen se visualizará con esa gama de colores.

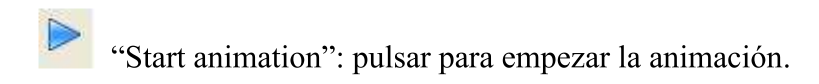


Animar series

Permite observar la serie en forma de animación
Al pulsar este icono se activa una barra que se adosa a la derecha de la imagen activada. Si pinchamos en otra imagen, la barra se desplaza a la nueva imagen seleccionada.



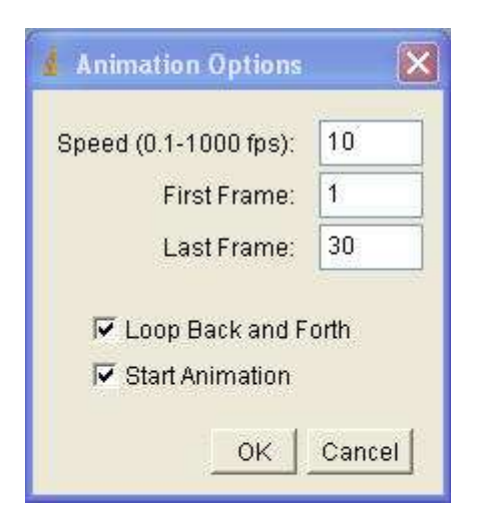
En la barra de “animar series” encontramos los siguientes botones:



“Start animation”: pulsar para empezar la animación.

“Stop animation”: pulsar para parar la animación.

“Animation options”: abre una nueva ventana en la que podemos definir las opciones de la animación:



Podemos modificar la velocidad de la animación (“Speed”; imágenes por segundo) y también indicar cuál será la primera imagen (“First Frame”) y la última “(Last Frame”). Si activamos la opción “Loop Back and Forth” la animación irá del inicio al final y del final al inicio (efecto ping-pong). Si señalamos la opción “Start animation” la animación se activará inmediatamente al pulsar la casilla OK.

“Go to first slice”: abre la primera imagen de la animación.

“Previous slice”: abre la imagen anterior de la animación.

“Next slice”: abre la imagen siguiente de la animación.

“Last slice”: abre la última imagen de la animación.

“Delete slice”: elimina la imagen de la ventana .

“Add slide”: añade una imagen en negro.

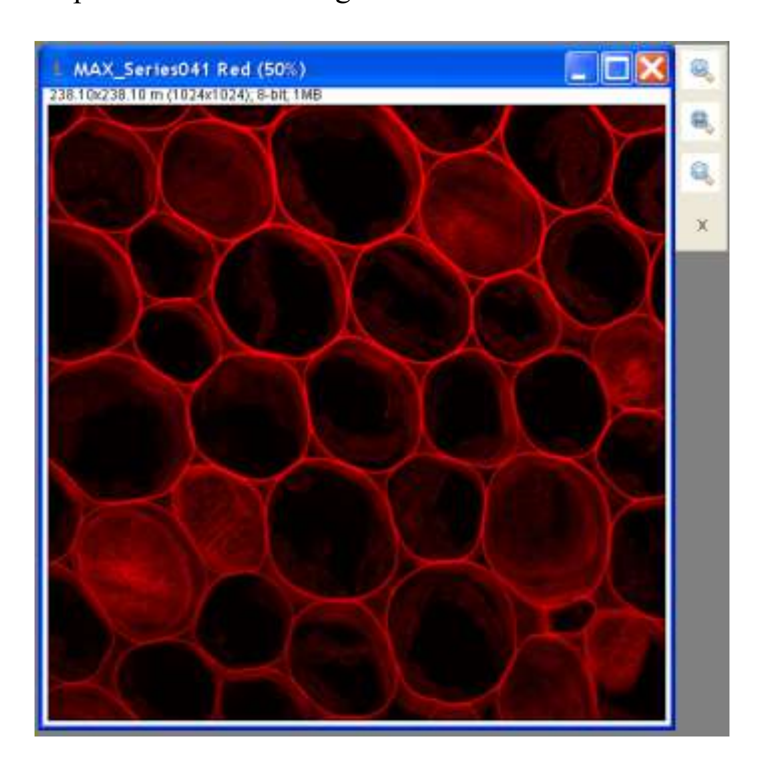
“Duplicate slide”: duplica la imagen de la ventana.

x Cierra el menú de “animar series”.



Zoom

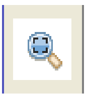
Permite ampliar o reducir el tamaño de la imagen activada.
Al pulsar este icono se activa una barra con funciones de zoom que se adosa a la derecha de la imagen activada. Si pinchamos en otra imagen, la barra de zoom se desplaza a la nueva imagen seleccionada.



Dentro de la barra de zoom encontramos los siguientes botones:



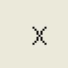
“Zoom out”: Pulsando este botón se disminuye el zoom de la imagen hasta 3.1%.



“Reset zoom”: Elimina el zoom y deja la imagen a tamaño real (100%).



“Zoom in” : Aumenta el zoom hasta 3200%.



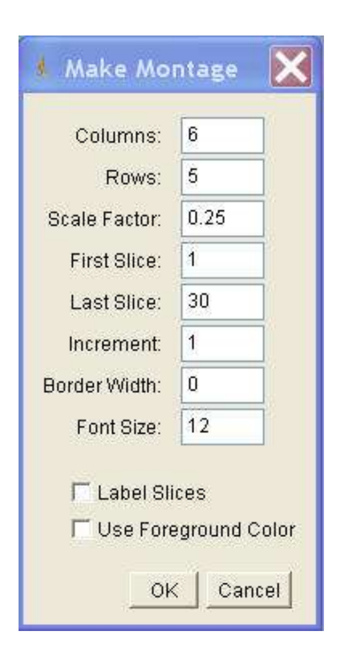
Cierra el menú de zoom.



Montaje

Permite realizar una galería de fotos a partir de una serie de imágenes.

Al pulsar este icono se abre una ventana con las opciones para realizar el montaje.



En este menú podemos seleccionar el numero de columnas y filas que queremos en el montaje ("Colums" y "Rows", respectivamente).

Con la opción "Scale Factor", el programa reajusta el tamaño de cada imagen en función del número de columnas y filas definidas.

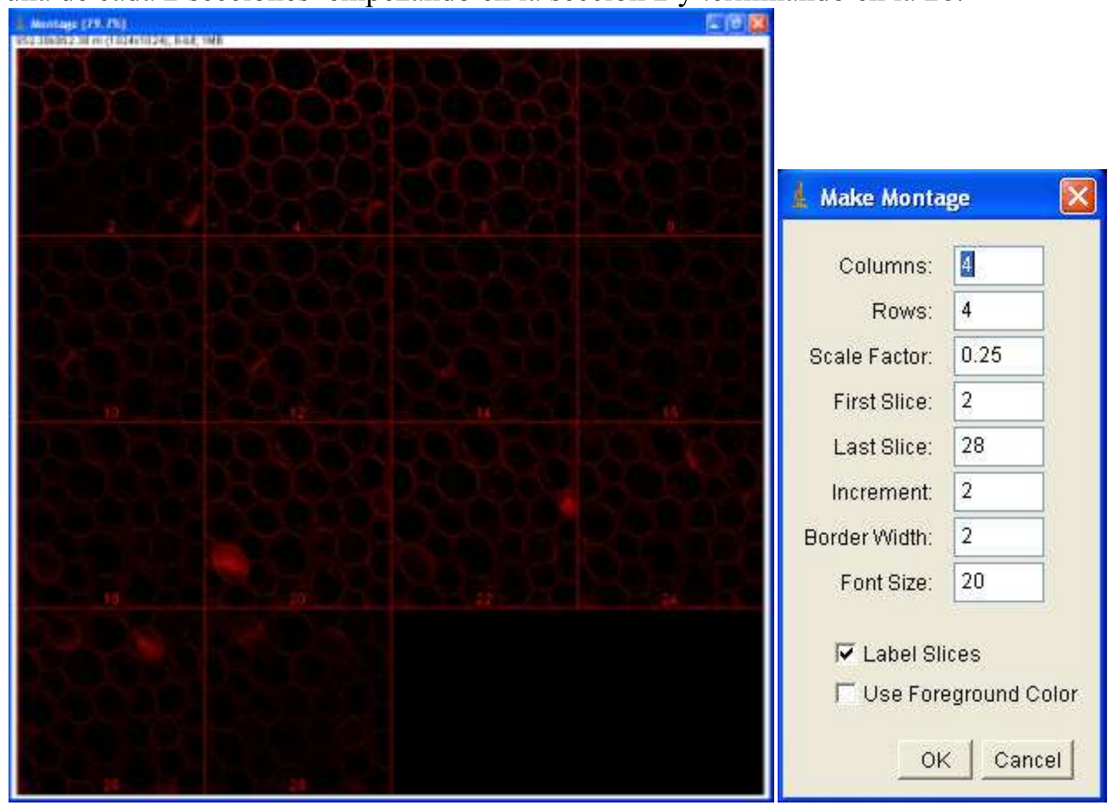
Las opciones "First slice" y "Last slice" permiten seleccionar cuál queremos que sea la imagen inicial y la imagen final de la serie para el montaje.

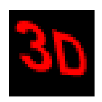
Con la opción "Increment" podemos seleccionamos todas las imágenes de la serie ("increment" = 1) o una imagen sí y otra no ("increment" = 2), etc.

Con "Border With" podemos dejar una imagen al lado de la siguiente sin separación ("Border With"= 0) o separar cada imagen en el montaje con una línea ("Border With"=1). Si incrementamos el valor de "Border With" el grosor de la línea aumenta.

Si señalamos la opción “Label Slides”, cada imagen del montaje irá señalada por un número que indica la posición de dicha imagen en la serie. El tamaño de este número lo podemos modificas con al opción “Front size”.

El siguiente ejemplo realiza un montaje de una serie de 30 secciones ópticas, tomando una de cada 2 secciones empezando en la sección 2 y terminando en la 28.



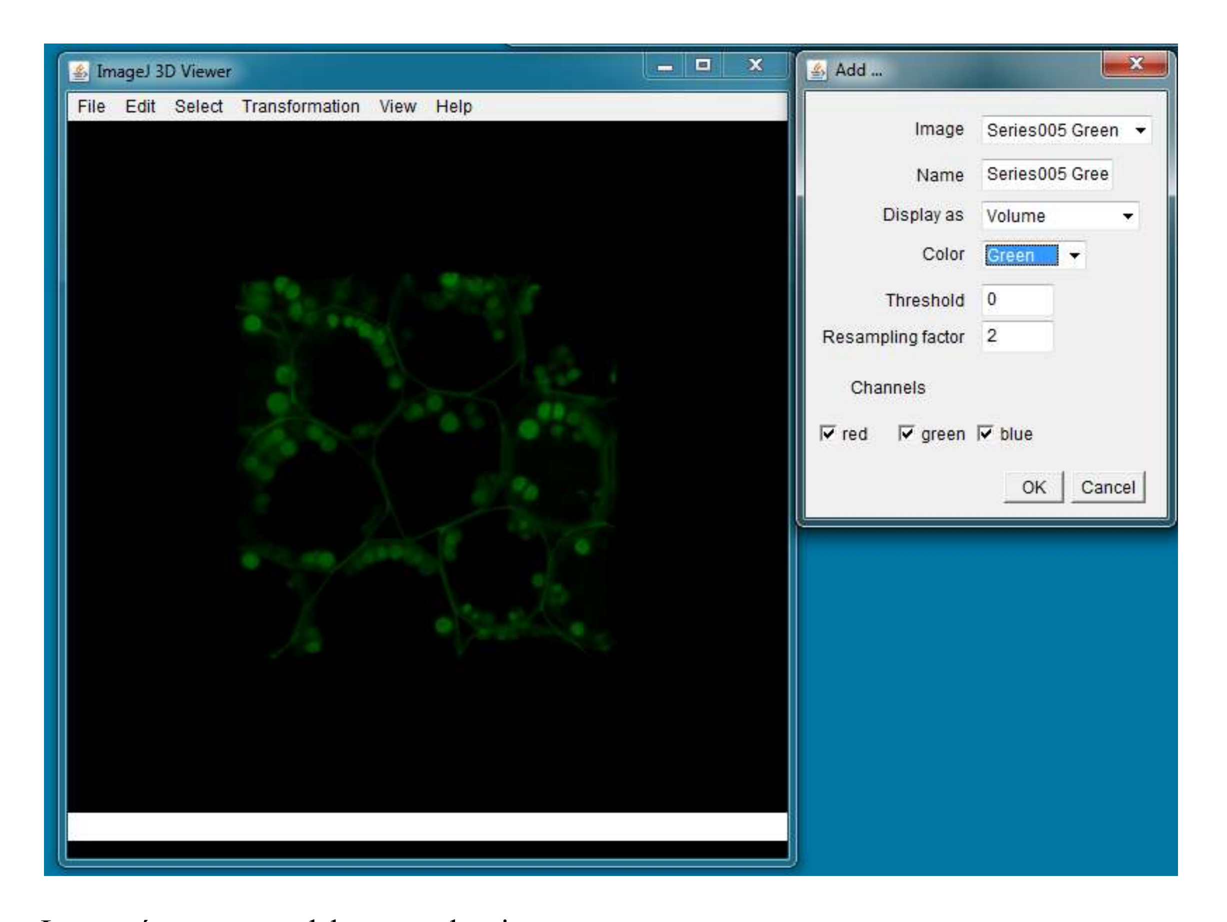


Visor de imágenes 3D

Realiza reconstrucciones en tres dimensiones de una serie de imágenes sucesivas de un volumen de muestra y las visualiza en diferentes formatos.

Al pulsar en el icono se nos abre la ventana de visualización. Previamente tenemos que tener abiertas la serie de imágenes que queremos visualizar.

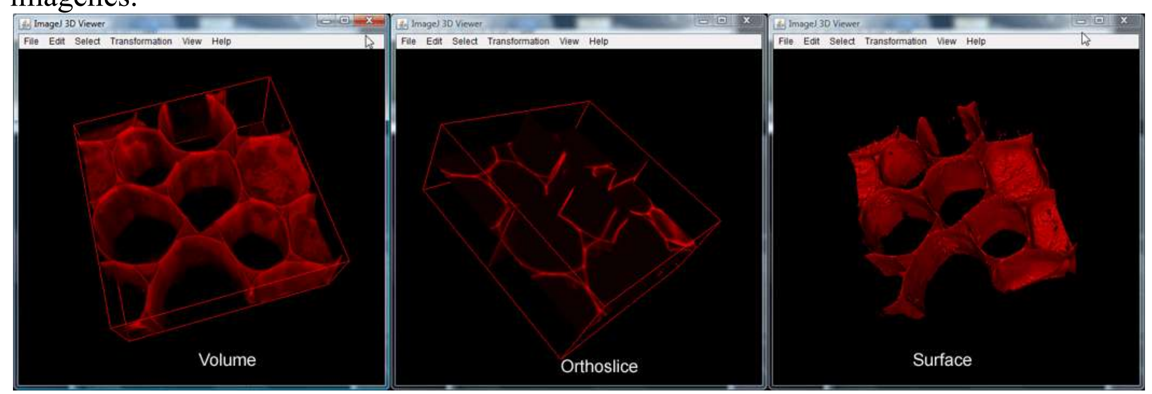
Para cargar una serie de imágenes en la ventana de visualización iremos a: “File / Add content”. Se abrirá el siguiente menú:



Los parámetros que debemos seleccionar son:

- **Image.** Seleccionaremos la serie de imágenes que queremos visualizar, podemos seleccionar cualquier serie de imágenes que tengamos abierta.
- **Name.** El nombre de este contenido en el visor. Puede haber más de un contenido visualizándose simultáneamente.
- **Display as**. Método de visualización del volumen. Tenemos tres opciones:
  - **Volume**. La imagen se visualiza como un volumen con la información de todos los píxeles en el espacio tridimensional.
  - **OrthoSlice**. Se visualizan tres secciones ortogonales (x,y,z).
  - **Surface.** Se visualiza un volumen renderizado.
- **Color**. Permite seleccionar el color en el que queremos visualizar el objeto.
- **Threshold**. En caso de que elijamos la opción “surface” indica la porción de volumen que se visualiza en función de su intensidad. Las zonas del volumen que tienen una intensidad por debajo del valor de Threshold no se visualizan.
- **Resampling factor.** Es el factor por el que la serie de imágenes es remuestreada para realizar la renderización. Un factor de 1 utilizará todas las secciones para renderizar , un factor de 3 utilizará 1 de cada 3 secciones en la renderización. Cuanto menor es este factor más exacta es la renderización y más tarda en realizarla.
- **Channel**s. Si estamos visualizando una imagen en color marcaremos los canales que queremos visualizar. En caso de imágenes monocromas podemos dejar marcados los tres.

A continuación pueden verse tres tipos de visualización 3D de la misma serie de imágenes.



Para variar la vista del objeto utilizaremos las siguientes combinaciones de herramientas de ImageJ y botones del ratón:

Operación	Herramienta de ImageJ	Procedimiento
Rotar		Mover el ratón pulsando el botón izd
Desplazar		Pulsar la tecla “shift” y mover el ratón pulsando el botón izd.
Zoom		Mover la rueda del ratón
Zoom		Mover el ratón pulsando el botón izd

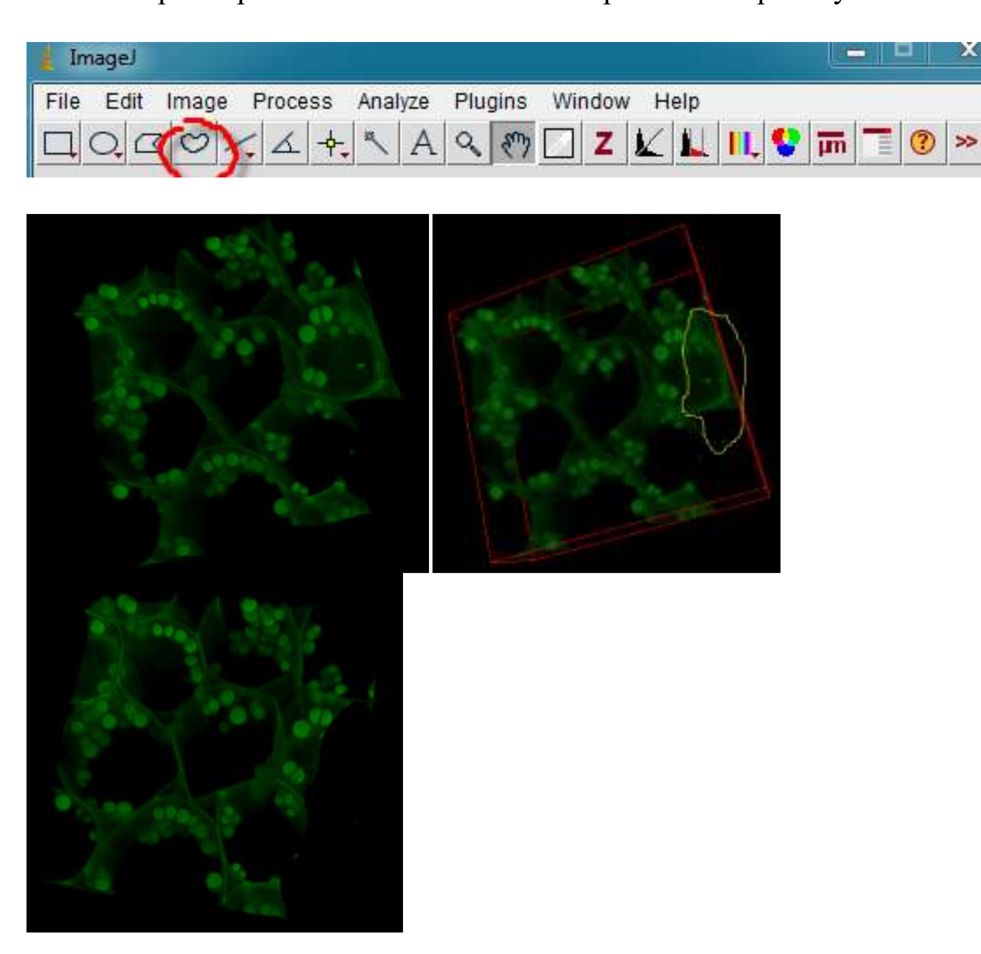
Como es posible tener más de un contenido visualizándose simultáneamente podemos rotar simultáneamente todos los contenidos o uno de ellos. Para rotar un contenido pulsaremos sobre él para seleccionarlo y nos aparecerá un recuadro marcando el contenido. Si realizamos la operación de rotar únicamente girará ese contenido. Para rotar todos los contenidos hay que pulsar con el ratón en una zona en que no haya nada, para deseleccionar todos los contenidos. Una vez deseleccionados si realizamos la rotación nos rotará todo.

Es posible cambiar el color o el modo de visualización de un contenido, para ello primero debemos seleccionar dicho contenido (nos parecerá el recuadro rojo) y a continuación pulsando en “edit” seleccionaremos “display as” para cambiar el modo de visualización o “attributes” para cambiar los atributos de la imagen (color, transparencia, threshold, etc).

La opción “fill selection” del menú “edit” ofrece la posibilidad de eliminar zonas de nuestro volumen. Esta opción sólo funciona en el modo de visualización de volumen. Para trabajar con esta opción primero seleccionaremos el volumen del que queremos eliminar una zona, a continuación, en el menú de ImageJ seleccionaremos la herramienta de dibujo a mano alzada, a continuación marcaremos con el ratón la zona a

eliminar y seleccionaremos: “edit”/”fill selection”. La zona de volumen seleccionada se nos borrará de la imagen.

Con esta opción podemos cortar un volumen para ver lo que hay detrás.



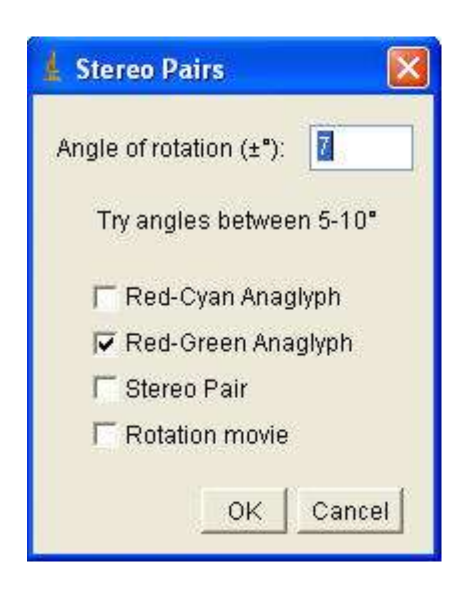
Esta función utiliza el pluging 3D Viewer desarrollado por Benjamin Schmid, Albert Cardona, Mark Longair, Johannes Schindelin (2)



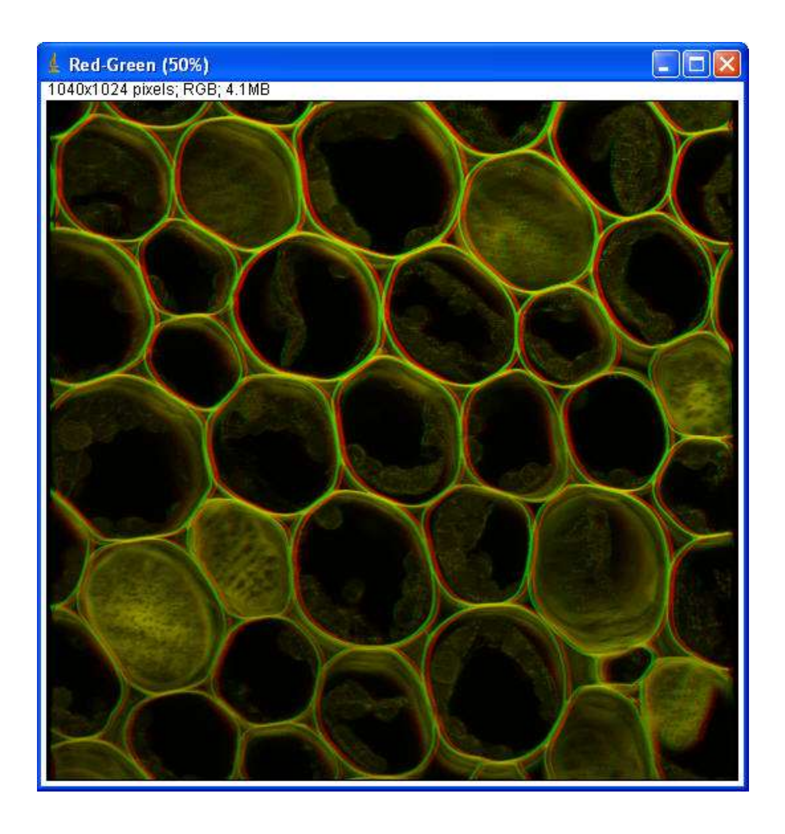
Par estereoscópico

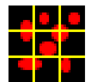
Permite crear un par estereoscópico a partir de una serie de imágenes.

Al pulsar el icono se abre una ventana en la que señalaremos la opción “Red-Green Anapglyph”.



El programa comienza a generar las dos proyecciones y finalmente muestra la imagen "Red-Green" que deberemos ver utilizando las gafas estereoscópicas ( ).

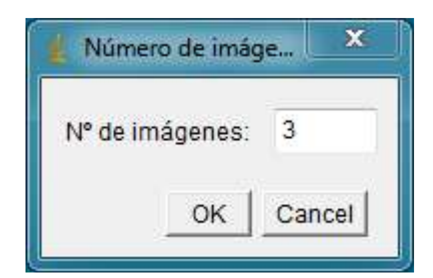




Pegar imágenes

Esta función permite pegar imágenes consecutivas para formar una única imagen (mosaico de imágenes). Las imágenes deben de tener una parte común para que el programa realice la unión de forma correcta.

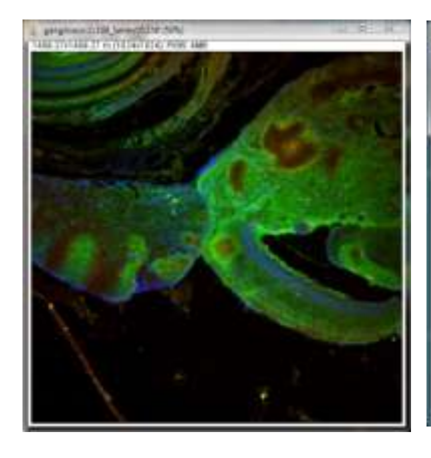
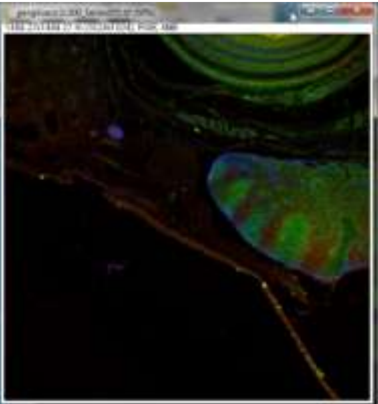
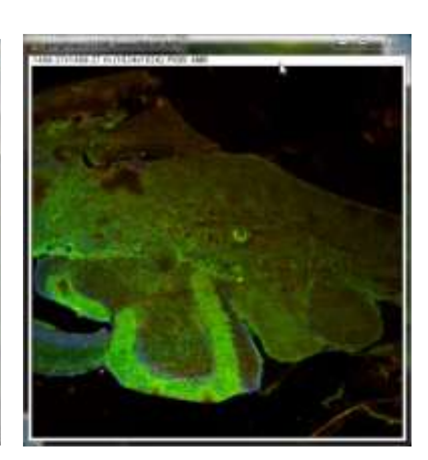
Al pulsar en el icono nos aparece un mensaje pidiéndonos el número de imágenes a pegar.



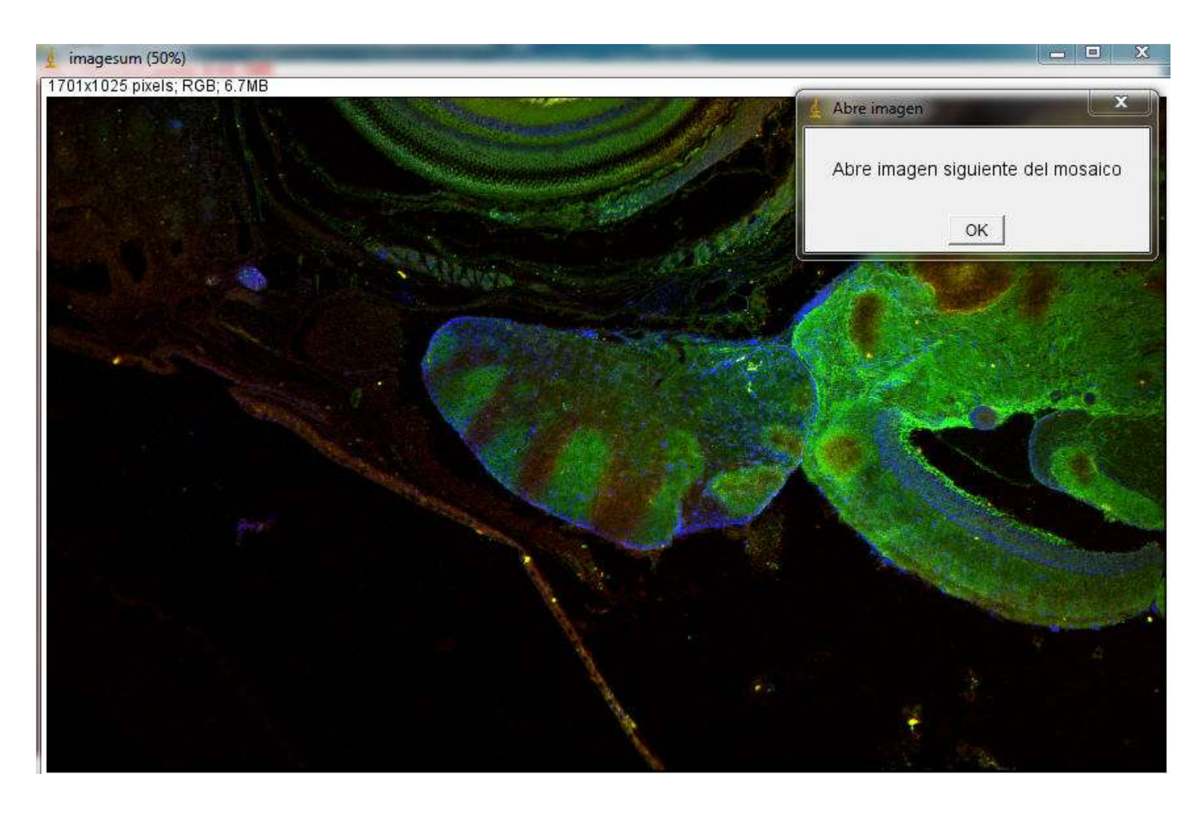
A continuación nos pedirá que abramos la primera imagen del mosaico



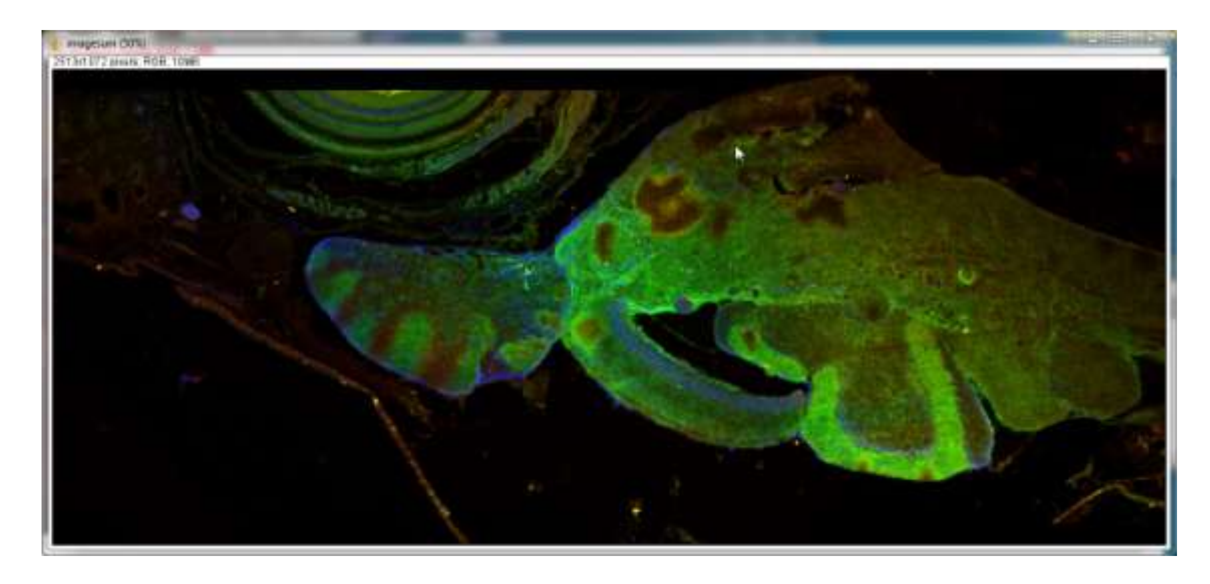
Pulsaremos OK y seleccionaremos la primera imagen, a continuación nos pedirá abrir la imagen siguiente que compone el mosaico. Esta imagen debe de tener una parte en común con la primera.

Una vez abierta la segunda imagen el programa iniciará la función de pegado. Deberemos esperar hasta que nos aparezca la imagen resultante (dependiendo del tamaño de las imágenes y de la potencia del ordenador este proceso puede llevar su tiempo).



Una vez mostrada la imagen resultante, si tenemos más imágenes para pegar, el programa pedirá que abramos la siguiente y la pegará al mosaico de las dos anteriores.



Este proceso se repetirá hasta que haya pegado todas las imágenes.

Cuando se trata de realizar mosaicos compuestos de varias filas de imágenes es aconsejable realizar los mosaicos de cada fila individualmente y posteriormente juntarlos.

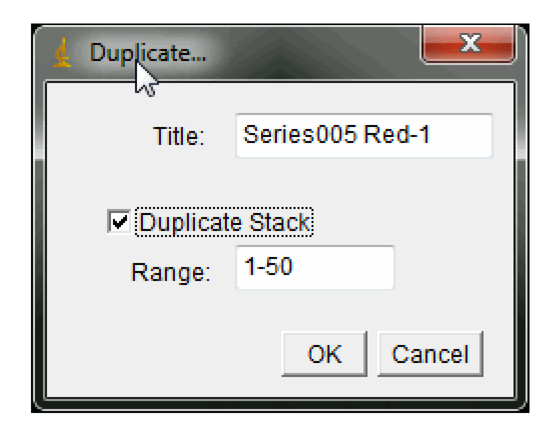
Esta función utiliza el pluging "Stitching" desarrollado por S. Preibisch, S. Saalfeld, P. Tomancak (3)



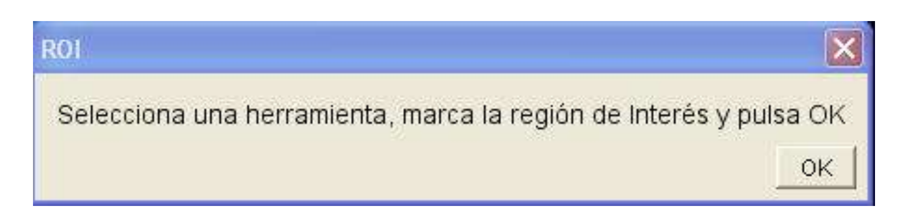
Seleccionar ROI

Permite seleccionar una región de interés (ROI; del inglés "region of interest") en nuestra imagen o serie.

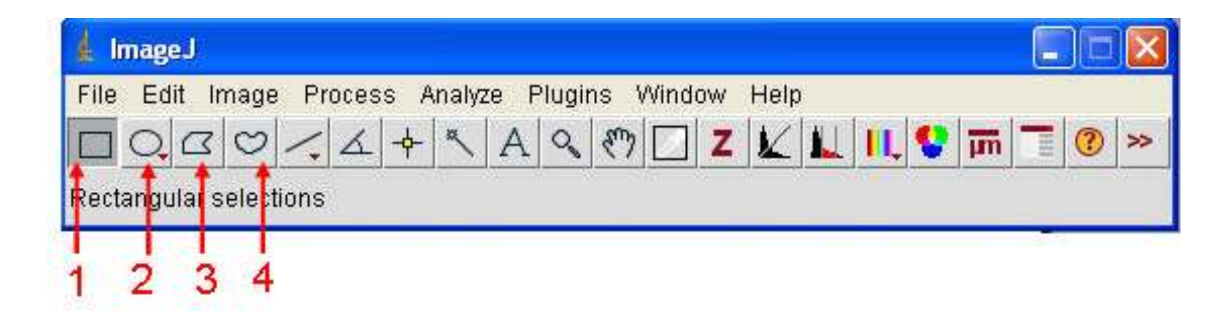
Al pulsar este icono aparece un mensaje en la pantalla para duplicar la imagen con el fin de que al extraer la región de interés no perdamos la imagen original:



Una vez duplicada la imagen aparece el siguiente mensaje :



Desde el menú principal de ImageJ (ver icono) deberemos seleccionar la herramienta necesaria para dibujar la ROI. Podemos seleccionar un rectángulo (1), un círculo (2), un polígono (3) o un dibujo a mano alzada (4).



Tras dibujar la ROI en nuestra imagen/serie, pulsaremos la casilla “OK” en el mensaje y la imagen se ajustará sólo a la ROI dibujada.

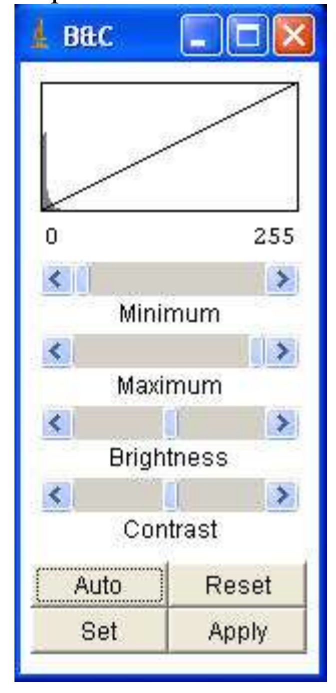
Si queremos dibujar varias ROIs en la imagen debemos mantener pulsada la tecla “mayúsculas – Shift”.



Ajustar Nivel Gris

Permite realizar un ajuste del brillo y contraste de la imagen o serie.

Al pulsar el icono se abre la siguiente ventana:



Moviendo las barras buscaremos el mejor ajuste de brillo y contraste para nuestra imagen.

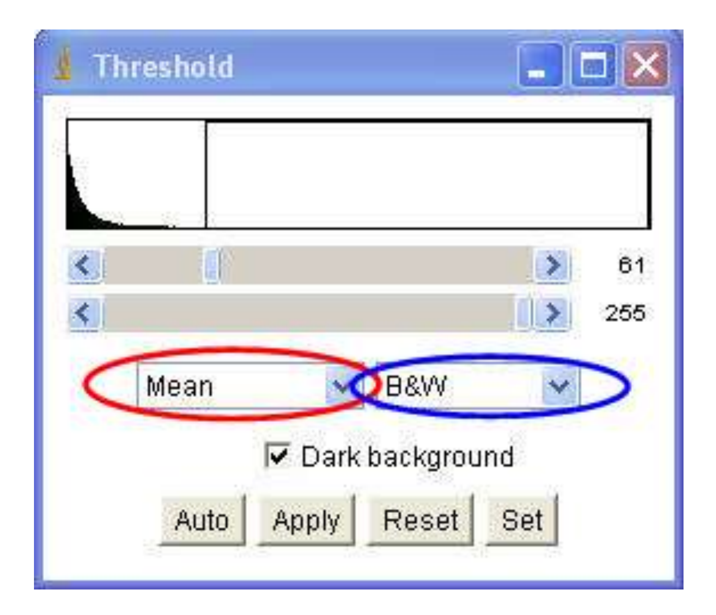
Los botones inferiores en la ventana nos permiten:

Auto: Image J aplica automáticamente el ajuste de niveles de gris que el programa cree adecuado para la imagen.
Reset: elimina los cambios realizados.
Set: permite escribir el valor mínimo y el valor máximo de intensidad para la imagen/ serie.
Apply: aplica los cambios realizados sobre la imagen/serie.



Segmentación

Permite trasformar nuestra imagen o serie en una imagen binaria.



Moviendo las barras buscaremos los mejores valores de segmentación para nuestra imagen.

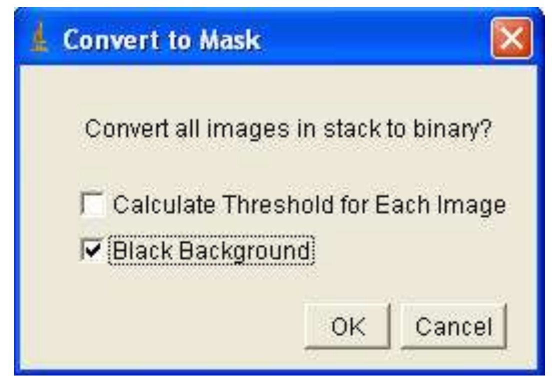
El recuadro señalado en rojo nos permite escoger entre diferentes métodos de segmentación.
En el recuadro señalado en azul seleccionaremos la opción "B&W" y la opción "Dark background" debe estar activada.

Los botones inferiores en la ventana permiten:

Auto: Se aplica automáticamente el método de segmentación elegido en la ventana anterior.

Reset: elimina los cambios realizados.
Set: permite escribir el valor mínimo y el valor máximo de segmentación para la imagen/ serie.
Apply: aplica los cambios realizados sobre la imagen/serie.

Una vez ajustados los valores de segmentación pulsaremos el botón “Apply” y se abrirá una nueva ventana:



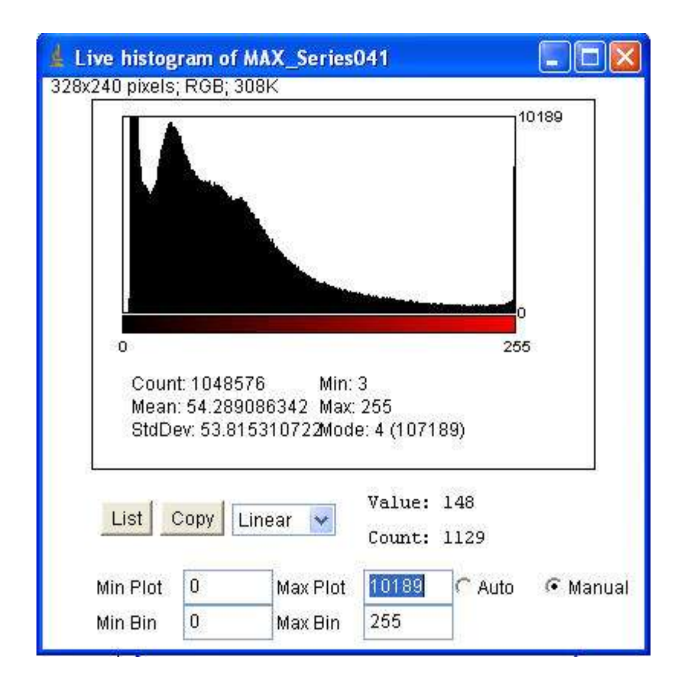
Deberemos activar la opción “Dark background” y pulsar “OK”
El resultado final de segmentación será una imagen binaria en la que el fondo tiene un valor de 0 y la señal de interés tiene un valor de 255.



Histograma interactivo

Permite conocer el histograma de intensidad de señal de nuestra imagen. Podemos aplicarlo a toda la imagen o a una región concreta de la imagen.

Al pulsar el icono, aparece la siguiente ventana:



Si seleccionamos el modo manual, podemos cambiar las escalas del histograma. Los valores “Min Plot” y “Max Plot” son para el eje Y y los valores “Min Bin” y “Max Bin” son para el eje X.

Al pulsar el recuadro “List”, se abre una nueva ventana con los valores de niveles de intensidad del histograma. Este listado lo podemos guardar como una tabla de datos (fichero de Excel).

Al pulsar el recuadro “Copy”, copiamos los valores de intensidad del histograma y podemos pegarlos en un documento de texto (Word) o en un fichero de datos (Excel).

Si estamos trabajando con una serie, podemos ir viendo el histograma de cada imagen de la serie.

Si queremos conocer el histograma de una región concreta de la imagen/serie, dibujaremos con el ratón un rectángulo sobre la imagen y el histograma se aplicará a la región dibujada.



IJ

Pulsando este icono desaparece el menú general de ImageJ y sólo queda en pantalla el menú que contiene las funciones de ConfocalUniovi ImageJ.

Si queremos volver a activar el menú general de ImageJ pulsaremos de nuevo en el icono.

Referencias:

1. W.S. Rasband. "ImageJ". U.S. National Institute of Health., MD (1997-2010). http://rsb.info.nih.gov/ij/.

2. Benjamin Schmid, Johannes Schindelin, Albert Cardona, Mark Longair and Martin Heisenberg. A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. *BMC Bioinformatics* 2010, **11**:274.

3. - S. Preibisch, S. Saalfeld, P. Tomancak (2009) Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions", *Bioinformatics*, **25**(11):1463-1465.